N°439

THÈSE

Article recouvrant en partie

LA THÈSE DE DOCTORAT ÈS SCIENCES NATURELLES

PRÉSENTÉE

A L'UNIVERSITÉ PAUL SABATIER DE TOULOUSE

PAR

Alain VEY

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

SUJET DE LA THÈSE

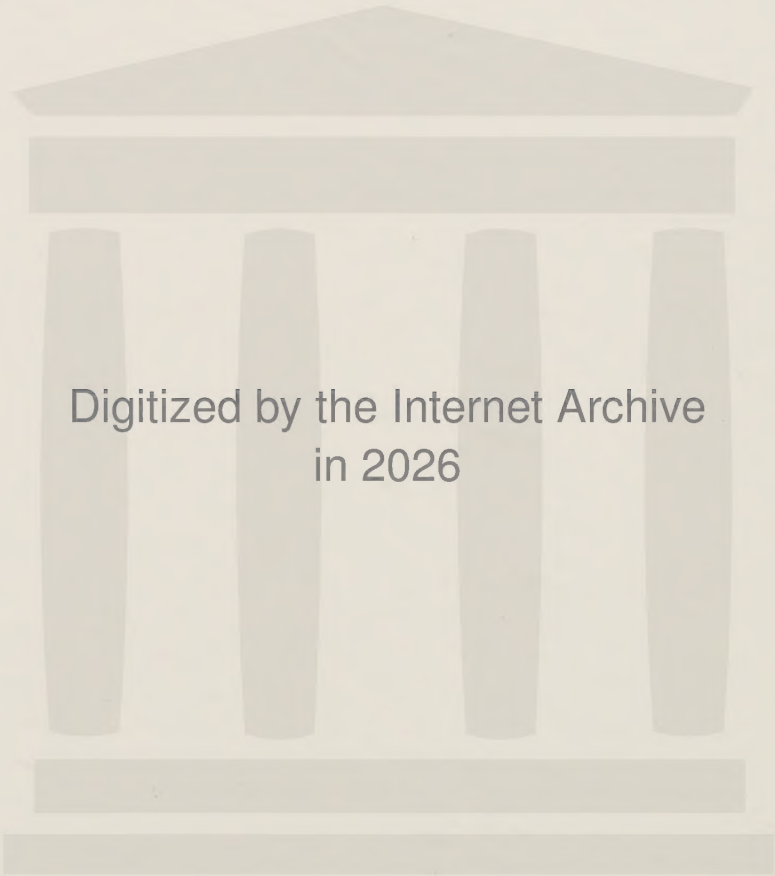
RECHERCHES SUR LA RÉACTION HÉMOCYTAIRE ANTICRYPTOGAMIQUE DE TYPE GRANULOME CHEZ LES INSECTES

Soutenue le 6 mai 1971 devant la commission d'examen :

MM. A. LEDOUX — *Président*

Ch. MONTANT
C. VAGO
J. CARAYON — *Examinateurs*

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
149, rue de Grenelle, Paris-7e


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536510_0031

Ann. Zool. Écol. anim., 1971, **3** (1), 17-30.

ÉTUDE DES RÉACTIONS CELLULAIRES ANTICRYPTOGAMIQUES CHEZ *GALLERIA MELLONELLA* L. : STRUCTURE ET ULTRASTRUCTURE DES GRANULOMES A *ASPERGILLUS NIGER* V. TIEGH [1]

A. VEY

Station de Recherches cytopathologiques, I. N. R. A., 30 - Saint-Christol-les-Alès

RÉSUMÉ

L'observation en microscopie photonique et électronique des granulomes à *Aspergillus niger* V. TIEGH. formés chez *Galleria mellonella* L. a permis de déterminer les caractéristiques des cellules qui participent à l'enveloppement du champignon et a montré qu'au sein du groupement serré qu'elles constituent, certaines présentent des modifications de structure fine dont la signification a été discutée.

Elle a en outre montré la présence fréquente d'un espace et d'un matériel intercellulaires, bien qu'il existe aussi des zones de jonction entre hémocytes voisins.

Le processus de mélanisation accompagnant l'agglomération des cellules autour du champignon et son évolution au cours de la vie de l'insecte, ou chez les granulomes éliminés, ont été étudiés.

A l'aide des résultats obtenus nous avons pu comparer les réactions cellulaires anticryptogamiques à d'autres phénomènes qui, chez les insectes, font également intervenir les hémocytes, et aux réactions inflammatoires des vertébrés.

INTRODUCTION

L'accumulation d'hémocytes formant un ensemble serré autour de corps étrangers, de parasites ou de microorganismes, constitue le type de réaction cellulaire sans doute le plus caractéristique chez les insectes.

Ce phénomène présente un grand intérêt en particulier parce qu'il conditionne pour une large part la résistance de l'hôte aux agents pathogènes.

[1] Ce travail est extrait de la thèse de Doctorat d'État de Sciences naturelles, soutenue en 1971 à l'Université Paul Sabatier de Toulouse et enregistrée sous le n° A 05327.

L'existence des réactions hémocytaires a été signalée depuis longtemps et elles peuvent être observées assez aisément, par exemple au cours des maladies cryptogamiques. On considère d'ailleurs très souvent qu'elles sont bien connues alors que les données concernant l'immunité de type humoral sont encore relativement limitées et imprécises.

Nous avons constaté qu'il n'en est rien et que l'on sait peu de choses sur la façon dont l'insecte réagit à l'infection par des mécanismes hémocytaires.

Ceci nous a conduit à entreprendre puis à poursuivre au cours des dernières années des recherches concernant de tels mécanismes chez des hôtes infectés expérimentalement, en choisissant des champignons entomopathogènes comme stimuli.

Nous avons tout d'abord étudié la réaction chez l'insecte vivant, qui conduit à la constitution de volumineux granulomes, en examinant des coupes histologiques d'individus où ce processus se trouve à différentes phases (VEY, QUIOT et VAGO, 1968 ; VEY, 1968).

Ensuite des expériences dans des conditions *in vitro* ont permis d'examiner en contraste de phase et de reconnaître les cellules participant à cette réaction, de suivre de manière continue son évolution, et de déterminer certains caractères de l'association des hémocytes (VEY, QUIOT et VAGO, 1968 ; VEY, 1969 *a*).

En outre la formation de granulomes nous est apparue comme un mécanisme de défense doué d'efficacité puisqu'elle permet des cas de résistance et de guérison (VEY et VAGO, 1969), alors qu'elle est perturbée et d'un effet plus réduit chez les insectes atteints par un agent pathogène autre que le champignon (VEY et VAGO, 1967 ; VEY, 1969 *b*).

Cependant, il nous a paru possible d'obtenir encore des données nouvelles concernant le type des cellules participant aux réactions anticryptogamiques, les modifications éventuelles de ces hémocytes dans le pseudo-tissu enveloppant le champignon et les liaisons s'établissant entre eux, ainsi que les changements de structure des granulomes au cours de la vie de l'insecte, par une étude histologique et histochimique détaillée et des recherches en microscopie électronique.

Nous avons donc entrepris d'approfondir, grâce à l'emploi de ces techniques, les connaissances sur la réaction de granulome chez *Galleria mellonella* L. infectée par *Aspergillus niger* V. TIEGH., car ce processus constitue un excellent prototype pour les travaux concernant les mécanismes de défense cellulaire des insectes.

I. — MATÉRIEL ET MÉTHODES

A. — *Obtention et prélèvement des granulomes*

Des larves de *Galleria mellonella*. L. (*Lepidoptera. Pyralidae*) ont été infectées par inoculation dans leur cavité viscérale d'une dose de 6,5 × 10^6 conidies d'*Aspergillus niger* v. TIEGH. en suspension dans l'eau physiologique, à l'aide d'un dispositif à micro-injection « Braun ». Elles ont ensuite été placées à 26°C et alimentées après 24 heures.

Pour l'étude sur coupes histologiques des granulomes qui se forment autour des éléments de l'*Aspergillus* nous avons fixé des larves, des chrysalides et imagos, *in toto* après section de la partie céphalique.

Pour la microscopie électronique nous avons choisi des granulomes âgés de 6 à 8 jours car ils sont bien développés. Ces formations, visibles grâce à leur partie centrale mélanisée, ont été prélevées après dissection à l'aide de fines aiguilles montées, accompagnées de fragments de tissus. Leur faible taille rend en effet les manipulations difficiles.

UNIV. LEIDEN BIBL.

B. — *Histologie et histochimie*

1. *Fixations.*

Les *Galleria* ont été fixées dans les liquides de Bouin, Carnoy, Halmi ou de Champy. Pour la recherche des lipides la fixation au formol-calcium de Baker a été suivie d'une postchromisation dans le mélange bichromate-sublimé d'Elftmann (Lison, 1960).

2. *Méthodes générales de coloration.*

Coloration de Van Gieson, Azan de Romeis modifié par emploi du rouge nucléaire solide, coloration de Mallory, Hémalun picro-indigo-carmin. Les trois premières méthodes ont l'intérêt d'être utilisées couramment dans l'étude des granulomes inflammatoires des Vertébrés.

3. *Méthodes adaptées à des études particulières.*

· Tissus conjonctifs : Imprégnation argentique de Gomori, Fuschine-paraldéhyde après fixation au Halmi.

· Inclusions hémocytaires : Fuschine anilinée d'Altmann après fixation au champy, selon le principe retenu par Nittono (1960) et en employant la technique de Benoit (Martoja et Martoja, 1967) pour le chondriome. Fuchsine paraldéhyde sans oxydation pour comparaison avec les résultats de Mitsuashi (1966).

4. *Réactions histochimiques.*

Les techniques utilisées sont, sauf exception, celles citées par Lison (1960).

· Polysaccharides et composés mucoïdes : acide periodique-Schiff selon le procédé de McManus (1946), avec contrôles traités à l'amylase salivaire à 37°C pendant une heure. Cette méthode réalise aussi une excellente coloration des éléments cryptogamiques.

· Mucopolysaccharides acides : Bleu alcian à pH 2,5 et Métachromasie (Bleu de toluidine à 0,05 p. 100 d'après Lison (1960).

· Lipides : coloration au noir soudan B alcoolique selon le procédé de Lison *et al.* (1960).

· Protéines : Tétrazoréaction de Danielli selon la technique de Burstone indiquée par Martoja et Martoja (1967). Ninhydrine-Schiff selon Yasuma et Ichikawa (1953).

· Acides nucléiques : réaction de Feulgen et Rossenbeck (1924) et laque de Gallocyanine d'après le procédé d'Einarson (1951).

· Mélanines : réaction argentaffine, méthodes de Masson (1914) et de Gomori (1948).

C. — *Microscopie électronique*

Les granulomes ont été fixés par la glutaraldéhyde à 0,5 p. 100 dans un tampon de cacodylate de sodium 0,1 M, additionné de 6 p. 100 de saccharose. Le pH du fixateur était ramené à 7.

Après une fixation d'une heure à 4°C les pièces ont été rincées trois fois avec le tampon cacodylate contenant du saccharose, puis post-fixées par le tétraoxyde d'osmium dans le même tampon pendant une heure à une heure trente. Ensuite les granulomes ont été déshydratés dans un gradient d'acétone et inclus dans l'Epon.

L'examen des coupes ultrafines, déposées sur film de collodion carboné, et colorées par l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb, a été effectué au microscope Hitachi Hu 11 CS à 75 kV.

II. — OBSERVATIONS

Les granulomes à *A. niger* montrent, à partir de leur périphérie, 4 régions différentes :

— hémocytes entrant en contact avec le granulome, ou en début d'incorporation et conservant encore en partie leur individualité ;

— zone à cellules très étalées, d'aspect feuilleté ;

— zone avec cellules déformées mais peu allongées ;

— masse centrale mélanisée contenant les éléments mycéliens.

Nous exposerons le résultat des examens de ces différentes parties, d'abord sur coupes histologiques, puis sur coupes ultrafines préparées pour la microscopie électronique.

A. — *Étude histologique et histochimique*

1. *Cellules formant les granulomes.*

D'après nos premières observations (Vey, Quiot et Vago, 1968 ; Vey, 1969 *a*) les cellules participant aux réactions anticryptogamiques chez *G. mellonella* doivent être classées parmi les plasmatocytes, selon la terminologie proposée par Jones (1962). Si l'on effectue, comme Wittig (1965), une distinction entre micro-et macroplasmatocytes on reconnaît la présence de ces deux types de cellules dans le pseudo-tissu enveloppant le champignon.

Ces hémocytes, approximativement ronds ou ovoïdes au moment où ils entrent en contact avec le granulome, ont un cytoplasme présentant une légère coloration d'ensemble par l'A.P.S. et une teinte violacée claire après la tétrazoréaction de Danielli, correspondant à une réaction positive pour les protéines. La recherche de mucopolysaccharides acides a été négative.

Les cellules des granulomes se caractérisent par leur pauvreté en inclusions. Quelques-unes, à petit noyau et dont le système vacuolaire est développé, contiennent un nombre faible de fines granulations ou gouttelettes, dont une partie est certainement de nature lipidique. De telles cellules sont considérées par certains auteurs comme des « hémocytes granuleux » (Nittono, 1960 ; Wittig, 1960) mais il nous paraît préférable de réserver ce terme, comme l'a fait Jones (1962), à des hémocytes contenant des inclusions de taille généralement plus grande, plus uniformes et surtout plus abondantes.

L'emploi du bleu d'aniline, de la fuchsine paraldéhyde, et du bleu de toluidine pour la métachromasie, montre l'absence de tels granules, ainsi que de « sphérules » dans les hémocytes formant les granulomes. De plus aucune de ces cellules ne paraît présenter les caractères histochimiques des adipohémocytes, en particulier de nombreuses granulations APS positives (Ashurst et Richards, 1964 ; Beaulaton, 1968).

Enfin nous n'avons pas rencontré dans le pseudo-tissu d'hémocytes contenant des inclusions particulières colorables par la fuchsine d'Altman et comparables à celles mises en évidence par Nittono (1960) dans les œnocytoïdes de *Bombyx mori* L.

2. *Structure du pseudotissu hémocytaire.*

La paroi des granulomes âgés d'une semaine environ est devenue très épaisse. La partie feuilletée, bien développée, est composée de plasmatocytes qui en s'étalant fortement et se fixant ont pris l'aspect de fibroblastes du tissu conjonctif des vertébrés, comme nous l'avons observé avec d'autres auteurs (Flandre *et al.*, 1968) dans la formation de granulomes à corps étranger inerte.

Cet aspect feuilleté est dû à l'alternance des hémocytes très minces et d'un matériel intercellulaire paraissant constituer des fibres, dont nous avions déjà signalé l'existence (Vey et Vago, 1969).

Les affinités de ce matériel sont très difficiles à déterminer étant donné sa très faible épaisseur lorsqu'on l'examine au microscope optique.

Nous avons pu surtout constater qu'il se colorait en noir par l'imprégnation argentique de GOMORI (fig. 1) et présentait une certaine affinité pour le bleu d'aniline.

Dans l'étude des réactions inflammatoires des Vertébrés on considère qu'une réaction positive à l'imprégnation argentique révèle électivement les formations collagènes (FLANDRE, DAMON et SECCHI, 1969). Mais cette méthode pourrait en fait mettre aussi en évidence de nombreux hydrates de carbone et colorer les mélanines (LISON, synthèse 1960). Le matériau étudié pourrait donc être constitué de mélanines qui, en début de syntèse et en petites quantités, ne présenteraient pas de coloration spontanée perceptible. Cependant aucune coloration n'apparaît au niveau intercellulaire avec la réaction argentaffine (procédés de MASSON et de GOMORI). Il ne s'agirait donc pas de mélanines, mais de polysaccharides ou plus probablement de substances voisines de celles formant les fibres collagènes ou réticulées.

Nous n'avons par contre pas rencontré dans les granulomes d'éléments présentant les affinités des fibres élastiques.

Après leur incorporation dans les granulomes les cellules sanguines ne semblent pas présenter d'altérations notables malgré leur association étroite. On remarque, cependant, la faible colorabilité des plus internes.

3. *Mélanisation du cryptogame.*

Les éléments cryptogamiques enfermés dans les granulomes sont entourés d'un dépôt irrégulier, jaune à brun noirâtre, présentant par conséquent la coloration spontanée des mélanines.

Les substances qui le constituent sont insolubles dans le xylène, l'acétone, le benzène et l'éther. Elles montrent une très grande résistance aux agents chimiques puisqu'elles ne montrent pas de modifications après un traitement de 24 heures par l'acide chlorydrique concentré.

Ce matériel se décolore sous l'effet de l'acide peracétique, qui permet même le blanchiment des mélanines résistantes, alors que le permanganate de potassium et le diaphanol n'ont que peu d'effet.

Enfin, il manifeste également un caractère réducteur envers les sels d'argentamine. Cette propriété est très caractéristique des mélanines puisqu'elle sert de base à la méthode de MASSON pour la mise en évidence de ces substances (LISON, 1960 p. 725).

Le dépôt entourant des éléments d'*A. niger* présente donc tous les caractères physiques et histochimiques fondamentaux des mélanines.

Nous avons observé qu'au-delà de la zone fortement pigmentée entourant immédiatement le champignon peut s'étendre un voile plus léger paraissant envelopper les cellules voisines devenues moins visibles. On parvient cependant à bien distinguer le noyau de ces hémocytes qui paraît resté normal.

4. *Aspect des granulomes chez les chrysalides et les imagos.*

Dans le cas de résistance et de guérison on retrouve un grand nombre de granulomes chez les chrysalides et adultes nés de larves infectées (VEY et VAGO, 1969).

La structure de ces formations est très proche de celle observée au stade larvaire. On note cependant une progression de la mélanisation à l'intérieur du massif

hémocytaire. Chez les papillons par exemple on peut reconnaître des hémocytes assez nombreux pris dans une large zone pigmentée, lorsque celle-ci n'est pas trop fortement colorée (fig. 2). Ainsi, alors qu'au cours des premiers jours suivant l'infection la mélanisation se limite à une gaine autour du champignon, ultérieurement l'incorporation de cellules dans la masse centrale brunâtre des granulomes, commencée chez la larve, devient de plus en plus importante. Chez la chrysalide et l'imago le processus d'accumulation des hémocytes autour du cryptogame paraît généralement terminé. Cependant, au stade nymphal, des cellules semblent parfois venir encore se fixer à la surface du granulome.

Malgré cette cessation de l'apport de nouveaux hémocytes on ne constate pas de variations significatives de l'importance des enveloppes hémocytaires selon le stade de développement considéré. Il n'y a donc pas de signe paraissant indiquer que les granulomes subissent des remaniements importants tels que les départs de cellules.

5. *Granulomes éliminés.*

Quelques jours après l'inoculation on trouve chez la larve des granulomes en position tout à fait périphérique paraissant logés entre la cuticule et l'hypoderme. Ce dernier, qui les enveloppe grâce à un étirement de ses cellules qui peut être très marqué (fig. 3), est en fait souvent accompagné par quelques minces couches d'un matériel de nature cuticulaire, en relation avec la partie profonde de l'endocuticule.

Ces formations ont subi une modification de leur structure et se présentent essentiellement comme un corps fortement mélanisé dans lequel on reconnaît des filaments mycéliens. Parfois, on retrouve des traces de structure feuilletée dans la masse brunâtre, ou on observe autour de cette dernière quelques cellules apparemment normales.

Après la mue nymphale on retrouve les mêmes granulomes éliminés (fig. 4), attachés à l'exuvie, leur aspect ne s'étant pas beaucoup transformé. On parvient à les identifier surtout grâce à la présence de quelques filaments mycéliens, souvent très tortueux.

B. — *Ultrastructure des granulomes*

1. *Caractéristiques des cellules participant à la réaction.*

Les hémocytes qui participent à la formation des granulomes à *A. niger* ont une surface qui présente des digitations plus ou moins longues et des invaginations. Leur noyau (fig. 5 N), généralement volumineux, occupe souvent la moitié ou les deux tiers du diamètre total de l'hémocyte, mais est parfois moins important. Certains noyaux possèdent des expansions leur donnant un aspect lobé.

Ces hémocytes sont riches en ribosomes libres et en réticulum endoplasmique granulaire. Les citernes (fig. 5, ce) sont fréquemment distendues, leur contenu clair apparaissant condensé dans certains sacs. Au niveau périnucléaire elles peuvent également être dilatées et parfois en rapport avec le réticulum endosplasmique. Dans quelques cellules dont le noyau occupe presque tout le volume l'ergastoplasme, au profil tubulaire, est particulièrement abondant.

Les mitochondries sont assez nombreuses, de type classique, petites, fréquemment allongées (fig. 5, m).

Le cytoplasme de ce type d'hémocytes renferme aussi des vacuoles de tailles

diverses (fig. 5, v) dont le volume est parfois très important, et qui peuvent contenir un matériel non identifié, ou du plasma précipité comme cela a été observé par GRIMSTONE, ROTHERAM et SALT (1967) dans les hémocytes d'*Ephestia kuehniella* ZELLER.

Enfin ces cellules renferment des microtubules et des inclusions jamais très nombreuses, essentiellement des formations petites, denses et paraissant limitées par une membrane (fig. 5, id).

Si l'on se réfère aux travaux sur l'ultrastructure des hémocytes d'insectes (HOFFMANN *et al.*, 1969 ; STANG-VÖSS, 1970), en particulier ceux concernant les Lépidoptères (HARPAZ, KISLEV et ZELCER, 1969 ; WITTIG, 1970), on constate que les cellules formant les granulomes présentent bien la structure fine caractéristique des plasmatocytes. Cependant quelques-unes, à très gros noyaux, semblent devoir être considérées comme des prohémocytes.

La recherche d'autres types hémocytaires dans les granulomes a été négative, comme lors des examens sur coupes histologiques.

Les hémocytes granuleux caractérisés par leurs inclusions denses, non structurées, de taille relativement importante (GRANADOS, WARD et MARAMOROSCH, 1968 ; BARRA, 1969 ; HARPAZ, KISLEV et ZELCER, 1969) ne paraissent pas participer à la formation des granulomes, de même que les cellules à sphérules, les adipohémocytes ou les œnocytoïdes. Ces trois derniers types peuvent en effet être reconnus grâce à d'abondantes inclusions particulières telles que des faisceaux de tubules ou des vacuoles claires, ou à une disposition spéciale des ribosomes, bien que quelques désaccords existent encore entre les différents auteurs en ce qui concerne leur structure fine (HOFFMANN, 1966 ; CASSIER et FAIN-MAUREL, 1968 ; BEAULATON, 1968 ; HARPAZ, KISLEV et ZELCER, 1969).

2. *Cellules de la zone feuilletée.*

Les cellules fortement étirées de la zone de l'enveloppe hémocytaire à aspect feuilleté ont une épaisseur d'environ 2,5 μ dans leur partie large alors qu'elles n'atteignent que quelques centaines d'Å dans leur région distale. Leur extrémité, bien que très fine, est arrondie.

Dans l'ensemble ces hémocytes sont disposés régulièrement et simplement en couches successives. Cependant un examen attentif de leur profil permet de constater qu'ils peuvent présenter des excroissances de formes diverses (fig. 6).

La structure des cellules de cette zone de l'enveloppe des granulomes diffère très peu de celle des hémocytes libres. On remarque surtout que les microtubules, mais aussi les membranes du réticulum endoplasmique, tendent à se disposer parallèlement au plan d'étalement de l'hémocyte (fig. 7). Pour les microtubules une telle disposition a déjà été observée par GRIMSTONE, ROTHERAM et SALT (1967) et par HOFFMANN *et al.* (1968).

Des inclusions denses apparaissent dans certains des hémocytes très étalés, généralement ceux en position la plus profonde.

3. *Cellules de la partie centrale.*

Les cellules de la partie interne des granulomes sont le plus souvent peu allongées ou à peu près isodiamétriques. Des parties de leurs membranes ont un dessin très compliqué, leur surface étant modelée sur celle des hémocytes voisins.

On est frappé par la présence dans ces hémocytes d'inclusions cytoplasmiques de plusieurs types, de plus en plus nombreuses et volumineuses lorsqu'on va vers le centre des granulomes. Les plus abondantes, de taille variable, souvent subsphériques, mais parfois plus irrégulières, sont formées d'un matériau dense aux électrons, homogène, et sont séparées du cytoplasme par une membrane (fig. 8). Elles peuvent présenter une ou quelques petites vacuoles périphériques.

D'autres inclusions, en nombre beaucoup plus faible, se présentent comme des vacuoles limitées par une membrane, contenant des ribosomes, des éléments ergastoplasmiques ou des vésicules peut-être de même nature, et dans certains cas des corpuscules denses (fig. 9).

Des formations différentes, pouvant dériver des précédentes, comportent à la fois une substance dense, des vacuoles et des débuts de structures lamellaires (fig. 10), ou bien sont constituées essentiellement par des arrangements approximativement concentriques de membranes rappelant des figures myéliniques (fig. 11).

En dehors de la présence de ces inclusions les cellules examinées ne montrent pas de différences marquées avec les hémocytes circulants du point de vue de leur structure fine. Leurs noyaux paraissent normaux, elles sont particulièrement riches en ribosomes et renferment d'abondants microtubules.

4. *Zone mélanisée.*

L'enveloppe mélanisée qui entoure le champignon se présente en microscopie électronique comme un dépôt acellulaire, extrêmement opaque aux électrons, et d'épaisseur variée. Cet aspect est identique à celui de substances déposées autour de nématodes encapsulés et considérées comme des mélanines (Poinar, Leutenneger et Götz, 1968).

Mais parfois on observe au-delà une zone plus claire qui peut occuper un volume important. Nous avons pu déceler qu'elle correspond à un certain nombre de cellules que l'on reconnaît surtout grâce au dessin caractéristique de leurs membranes.

Ces hémocytes, parfois au nombre d'une dizaine, sont devenus assez denses aux électrons, leur cytoplasme présentant un aspect presque homogène. Si l'emplacement de certains organites peut être décelé aucun n'est resté identifiable (fig. 12).

Ces cellules, qui correspondent certainement à celles paraissant sur les coupes histologiques enveloppées dans un voile mélanisé, sont ici masquées par un dépôt fin répandu dans tout l'hémocyte, comme cela se produit dans les masses mélanotiques de certaines souches de drosophiles (Peroti et Bairati, 1968).

Chez la souche Tu B_3 ces masses formées d'hémocytes paraissant normaux, très serrés, mais cependant séparés par un espace intercellulaire rempli par un matériel opaque, et dont la partie centrale est mélanisée, présentent d'ailleurs un aspect d'ensemble très voisin de celui des granulomes à *A. niger*.

Les cellules constituant le pseudo tissu hémocytaire semblent étroitement serrées, surtout dans la partie centrale des granulomes. Cependant elles sont en fait souvent séparées par un petit espace dont on remarque l'importance très variable. Cet espace contient en général, à tous les niveaux, un matériel intercellulaire dense, d'aspect irrégulier, mais apparemment dépourvu de striations transversales aussi bien que d'une structure fibrillaire (fig. 13, m. d.).

Pourtant, au niveau de certaines zones, les membranes unitaires des hémocytes voisins sont intimement appliquées l'une contre l'autre, séparées par peu ou pas de

matériel opaque (fig. 14). Il se constitue donc des jonctions cellulaires présentant des points communs avec certains desmosomes des tissus normaux. L'absence de fusions de membranes accompagnées d'une mise en communication de contenus cytoplasmiques indique qu'il ne s'est pas formé de syncitium.

5. *Discussion.*

Le fait le plus remarquable observé au cours de notre étude des granulomes à *A. niger* en microscopie électronique est la présence, dans les cellules de la partie centrale, d'inclusions nombreuses et volumineuses de plusieurs types.

Nous avons recherché à quelles autres inclusions il serait possible de les comparer. Dans le domaine des réactions cellulaires des insectes il semble que ces structures présentent une grande similitude avec celles décrites par Grimstone, Rotheram et Salt (1967) sous le nom de « cytolysomes », bien que les éléments de comparaison soient un peu réduits étant donné le nombre très faible de figures présentées par les auteurs au sujet de ces formations.

Il a surtout été possible de constater des points communs sur le plan morphologique avec des structures qui ont récemment fait l'objet d'études détaillées, dans des travaux traitant de sujets très différents des nôtres. Il s'agit de formations dont l'activité lytique a été bien établie, et qui ont été observées dans les tissus d'insectes, surtout dans les glandes prothoraciques, ou glandes de mue (Beaulaton, 1967 *a* et *b* ; Cassier et Fain-Maurel, 1969 ; Garagozlou, 1969, 1970).

Les inclusions opaques aux électrons sont comparables aux « corps denses » ou « corps denses d'accumulation enzymatique » (Beaulaton, 1967 *a* ; Garagozlou, 1969). Les vacuoles peuvent être considérées comme des « vacuoles autophagiques » ou « vacuoles autolytiques » présentant des points communs par exemple avec celles décrites dans les glandes prothoraciques d'*Antherea pernyi* (Beaulaton, 1967 *b*). Les formations vacuolaires avec débuts de structures lamellaires, ainsi que les corps constitués essentiellement de feuillets sont assimilables aux formes d'évolution des inclusions précédentes. Les dernières présentent indiscutablement des caractères de « corps myéliniques » ou « résiduels » (Garagozlou, 1969), sans toutefois être composées entièrement de membranes à arrangement très régulier.

Cependant la nature de ces formations n'est pas démontrée puisqu'une analyse cytochimique portant sur la phosphatase acide, marqueur de choix des lysosomes, n'a pas encore été effectuée.

Même si l'on admet qu'il s'agit de structures lysosomiques et de vacuoles autolytiques, leur rôle reste difficile à interpréter. Chez les insectes leur apparition et leur multiplication a été surtout observée dans des organes en cours de dégénérescence spontanée. On sait également que des conditions anormales ou pathologiques peuvent entraîner des dégénérescences provoquées, avec apparition de vacuoles autolytiques (voir Cassier et Fain-Maurel, 1969, p. 105).

Mais les lysosomes peuvent aussi subir un cycle évolutif dans des tissus paraissant normaux, ce qui suggère alors leur intervention active dans certains processus métaboliques (Garagozlou, 1969).

Dans le cas des hémocytes des granulomes à *A. niger* la présence des inclusions observées semble indiquer une lyse partielle des cellules pouvant être provoquée par une insuffisance nutritionnelle, l'absence d'apport d'oxygène, ou aussi par l'action de substances nocives produites par le cryptogame.

Les zones de contact entre les hémocytes enveloppant le cryptogame sont semblables à celles observées par GRIMSTONE, ROTHERAM et SALT (1967) et POINAR, LEUTENEGGER et GÖTZ (1968). Elles peuvent être comparés à des desmosomes juxtamembranaires ou « tight junctions », dont on sait qu'ils n'ont pas une très grande résistance mécanique.

Les échanges entre espaces extracellulaires et entre ces espaces et l'hémolymphe sont certainement très faibles par suite de l'existence des accollements membranaires constituant des barrières et du matériel dense.

III. — CONCLUSIONS

Les réactions hémocytaires vis-à-vis d'*A. niger* chez *G. mellonella* sont assurées par des cellules présentant les caractères cytochimiques et ultrastructuraux des plasmatocytes, alors que, parmi les autres types de cellules sanguines, seuls les prohémocytes semblent aussi parfois intervenir.

Ces hémocytes normalement dispersés s'agglomèrent autour du champignon pour former un ensemble apparemment très serré. En fait, bien que leurs membranes présentent des zones de jonction assurant une certaine cohésion, limitée au pseudotissu, ils sont souvent séparés par un espace intercellulaire.

L'association prolongée des éléments sanguins a différentes conséquences, dont la plus frappante est un changement dans la structure fine des cellules les plus internes, consistant en l'apparition d'inclusions morphologiquement comparables à des structures lysosomiques et des vacuoles autolytiques, qui paraissent indiquer que les cellules ont subi une lyse partielle.

En outre, des cellules proches du champignon peuvent être touchées par un processus de mélanisation, alors que l'agent pathogène lui-même est entouré par une gaine pigmentée dont nous avons pu démontrer la nature mélanique.

Cependant, étant donné les très faibles modifications subies par les cellules de la partie externe de la paroi des granulomes et l'absence apparente de liaisons à grande résistance mécanique, il n'est pas étonnant que se produisent des détachements d'hémocytes périphériques après explantation *in vitro* (VEY, QUIOT et VAGO, 1968 ; VEY, 1969 *a*).

Lorsque les granulomes persistent pendant toute la vie de l'insecte, ils ne subissent pas de remaniements importants, mais l'extension de la zone pigmentée se poursuit jusque chez l'imago alors que la réaction des hémocytes cesse assez rapidement.

Ceux qui sont enveloppés par l'hypoderme et rejetés lors d'une mue montrent une modification de même type pouvant les amener à l'état de masse mélanisée que l'on parvient à reconnaître grâce aux éléments mycéliens.

Si l'on considère les résultats de nos études et des quelques autres travaux de microscopie électronique concernant les réactions cellulaires provoquées par différents stimuli, on est frappé par l'uniformité du type hémocytaire intervenant, et la grande similitude dans la structure des formations édifiées, en particulier en ce qui concerne les « capsules » à fragments d'araldite (GRIMSTONE, ROTHERAM et SALT, 1967).

Il est également intéressant de noter des ressemblances morphologiques certaines entre les granulomes à *A. niger* et les massifs hémocytaires mélanisés que constituent certaines masses mélanotiques des drosophiles (Perotti et Bairati, 1968).

Dans le domaine de la pathologie comparée, nos observations confirment l'opinion que nous avons exprimée avec Flandre, Vago et Secchi (Flandre *et al.*, 1968) en ce qui concerne les points communs et les différences entre les réactions inflammatoires des vertébrés et des invertébrés.

Les ressemblances sont nettes si l'on considère la morphologie du tissu de granulation, et en particulier l'existence d'un matériel intercellulaire. Les éléments de divergence concernent la formation chez l'insecte de dépôts persistants de mélanines accompagnant la réaction, ainsi que l'origine et la variété des types cellulaires intervenant. En effet, chez l'invertébré, l'édification des granulomes paraît essentiellement assurée par un seul type hémocytaire qui remplit à la fois le rôle des cellules réticulo-histiocytaire et des fibroblastes qui proviennent en grande partie du tissu conjonctif.

Reçu pour publication en novembre 1970.

SUMMARY

STUDIES OF ANTICRYPTOGAMIC CELLULAR REACTIONS IN *GALLERIA MELLONELLA* L. : STRUCTURE AND ULTRASTRUCTURE OF GRANULOMES RESULTING FROM THE INFECTION BY *ASPERGILLUS NIGER* V. TIEGH

Histological, histochemical and ultrastructural studies have been carried out on the granulomes formed in *Galleria mellonella* L. infected by *Aspergillus niger* v. tiegh.

These studies have shown that most of the cells participating in the antifungal reactions present the typical characters of plasmatocytes. These hemocytes, apparently very tight in the granulomes, are often separated by a narrow space containing an intercellular material, however they equally form zones of junction.

The cells of the internal part of the hemocytic envelope show some modifications of their fine structure which indicate that these hemocytes are probably lysed partially.

The fungal elements are surrounded by a deposit of melanine, but the cells in the near by can be also melanized. During insect life, or when the granulomes are eliminated, the pigmented zone increase in area.

Our observations have allowed to establish that the granulomes formed around *Aspergillus* present much similarities with other formations like different types of capsules or the melatonic masses of certain drosophila strains, and also show some characteristics in common with the inflammatory reactions of vertebrates

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ASHURST D. E., RICHARDS A. G., 1964. Some histochemical observations on the blood cells of the wax moth, *Galleria mellonella* L. *J. Morphol.*, **114**, 247-254.

BARRA T. A., 1969. Tégument des collemboles. Présence d'hémocytes à granules dans le liquide exuvia au cours de la mue. *C. R. Acad. Sci.*, Paris, **269**, 902-903.

BEAULATON J., 1967 *a*. Localisation d'activités lytiques dans les glandes du ver à soie du chêne (*Antheraea pernyi* GUÉR.) au stade prénymphal. I. Structures lysosomiques, appareil de Golgi et ergastoplasme. *J. Microscopie*, **6**, 179-200.

BEAULATON J., 1967 *b*. Localisation d'activités lytiques dans les glandes du ver à soie du chêne (*Antheraea pernyi* GUÉR.) au stade prénymphal. II. Les vacuoles autolytiques (cytolysomes). *J. Microscopie*, **6**, 349-370.

BEAULATON J., 1968. Étude ultrastructurale et cytochimique des glandes prothoraciques de vers à soie aux quatrième et cinquième âges larvaires. I. La *tunica propria* et ses relations avec les fibres conjonctives et les hémocytes. *J. Ultrastruct. Res.*, **23**, 478-498.

CASSIER P., FAIN-MAUREL M. A., 1968. Sur la présence de microtubules dans l'ergastoplasme et l'espace périnucléaire des œnocytoïdes du criquet migrateur *Locusta migratoria migratorioides* (R. et F.). *C. R. Acad. Sci.*, Paris, **266**, 686-689.

FAIN-MAUREL M. A., CASSIER, P., 1969. Étude infrastructurale des glandes de mue de *Locusta migratoria migratorioides* (R. et F.). II. Analyse des étapes de la dégénérescence chez les imagos grégaires. *Arch. Zool. Exp. Génér.*, **110**, 91-126.

FLANDRE O., DAMON M., SECCHI J., 1969. La réaction inflammatoire tissulaire chez les invertébrés. Colloque sur les manifestations inflammatoires et tumorales chez les invertébrés, Versailles, 1967. *Ann. Zool.-Écol. Anim.*, **1**, n° h.-s.

FLANDRE O., VAGO C., SECCHI J., VEY A., 1968. Les réactions hémocytaires chez les insectes. *Rev. Path. comparée Méd. exp.*, **5**, 101-106.

GHARAGOZLOU I. D., 1969. Existence d'inclusions lysosomiques dans les cellules adipeuses de *Periplaneta americana* (Blattidae). *C. R. Acad. Sci.* Paris, **268**, 2455-2457.

GHARAGOZLOU I. D., 1970. Infrastructure et activité lytique des lysosomes du tissu adipeux de *Periplaneta americana* (Blattidae). *J. Microscopie*, **9**, 563-566.

GRANADOS R. V., WARD L., MARAMOROSCH K., 1968. Insect viremia caused by a plant pathogenic virus : Electron microscopy of vectors hemocytes. *Virology*, **34**, 790-796.

GRIMSTONE A., ROTHERAM S., SALT G., 1967. An electronmicroscope study of capsule formation by insect blood cells. *J. Cell. Sci.*, **2**, 281-292.

HARPAZ I., KISLEV N., ZELCER H., 1969. Electron-microscopic studies on hemocytes of the egyptian cottonworm. *Spodoptera littoralis* (BOISDUVAL) infected with a nuclear-polyhedrosis Virus, as compared to noninfected hemocytes. I. Noninfected hemocytes. *J. Invertebrate pathol.*, **14**, 175-185.

HOFFMANN J. A., 1966. Étude des oenocytoïdes chez *Locusta migratoria* (Orthoptère). *J. Microscopie*, **5**, 269-272.

HOFFMANN J. A., STOEKEL M. E., PORTE A., JOLY P., 1968. Ultrastructure des hémocytes de *Locusta migratoria* (Orthoptère). *C. R. Acad. Sci.*, Paris, **266**, 503-505.

JONES J. C., 1962. Current concepts concerning insect hemocytes. *Amer. Zoologist.*, **2**, 209-246.

LISON L., 1960. *Histochimie et cytochimie animales*. Gauthier-Villars. Paris.

MARSCHALL K. J., 1966. Bau und Funktionen der Blutzellen des Mehlkäfers *Tenebrio molitor* L. *Z. Morphol. Ökol. Tiere*, **58**, 182-246.

MARTOJA R., MARTOJA-PIERSON M., 1967. *Initiation aux techniques de l'histologie animale*. Masson et Cie, Paris.

MITSUASHI J., 1966. Tissue culture of the rice stem borer, *Chilo suppressalis* WALKER (Lepidoptera : Pyralidae). II. Morphology and *in vitro* cultivation of hemocytes. *Appl. Ent. Zool.*, **1**, 5-20.

NITTONO Y., 1960. Studies on the blood cells in the silkworm, *Bombyx mori* L. (en japonais, résumé anglais.) *Bull. Sericult. Expt. Stn.* (Tokyo), **16**, 171-266.

PEROTTI M. E., BAIRATI A., 1968. Ultrastructure of the melanotic masses in two tumorous strains of *Drosophila melanogaster* (tu B_3 and Freckled). *J. Invert. Pathol.*, **19**, 122-138.

POINAR G. O. Jr., LEUTENEGGER R., GÖTZ P., 1968. Ultrastructure of the formation of a melanotic capsule in *Diabrotica* (Coleoptera) in response to a parasitic Nematode (Mermithidae). *J. Ultrastruct. Res.*, **25**, 293-306.

STANG-VOSS C., 1970. Zur Ultrastruktur der Blutzellen Wirbelloser Tiere. I. Über die Haemocyten der Larvae des Mehlkäfers *Tenebrio molitor*. *Z. Zellforsch.*, **103**, 589-605.

VEY A., 1968. Réactions de défense cellulaire dans les infections de blessures à *Mucor hiemalis* WEHMER. *Ann. Épiphyties*, **19**, 695-702.

VEY A., 1969 *a*. Étude *in vitro* des réactions hémocytaires anticryptogamiques des larves de Lépidoptères. Colloque sur les manifestations inflammatoires et tumorales chez les Invertébrés, 1967. *Ann. Zool. Écol. anim.*, **1**, nº h. s.

VEY A., 1969 *b*. Action de la densonucléose sur les réactions cellulaires du type granulome des larves de *Galleria mellonella* vis-à-vis du champignon *Aspergillus niger*. Colloque sur les manifestations inflammatoires et tumorales chez les Invertébrés, Versailles, 1967. *Ann. Zool.-Écol. anim.*, **1**, nº h.-s.

VEY A., VAGO C., 1967. Influence d'une maladie virale sur les réactions hémocytaires anticryptogamiques chez les Insectes. *C. R. Acad. Sci.* Paris, **265**, 1568-1570.

VEY A., VAGO C., 1969. Recherches sur la guérison dans les infections cryptogamiques d'insectes, Infection à *Aspergillus niger* v. TIEGH. chez *Galleria mellonella* L. *Ann Zool. Écol. anim.*, **1**. 121-126.

VEY A., QUIOT J.-M., VAGO C., 1968. Formation *in vitro* de réactions d'immunité cellulaire chez les insectes. *2 nd Intern. Coll. Invert. tissue cult. Tremezzo*, 1967.

WITTIG G., 1965. Phagocytosis by blood cells in healthy and diseased caterpillars. I. Phagocytosis of *Bacillus thuringiensis* BERLINER in *Pseudaletia unipuncta* (HAWORTH). *J. Invert. Pathol.*, **7**, 474-488.

WITTIG G., 1970. Electron microscopic characterization of insect hemocytes. *Twenty-six annual E. M. S. A. meeting*. 2 p.

PLANCHE I

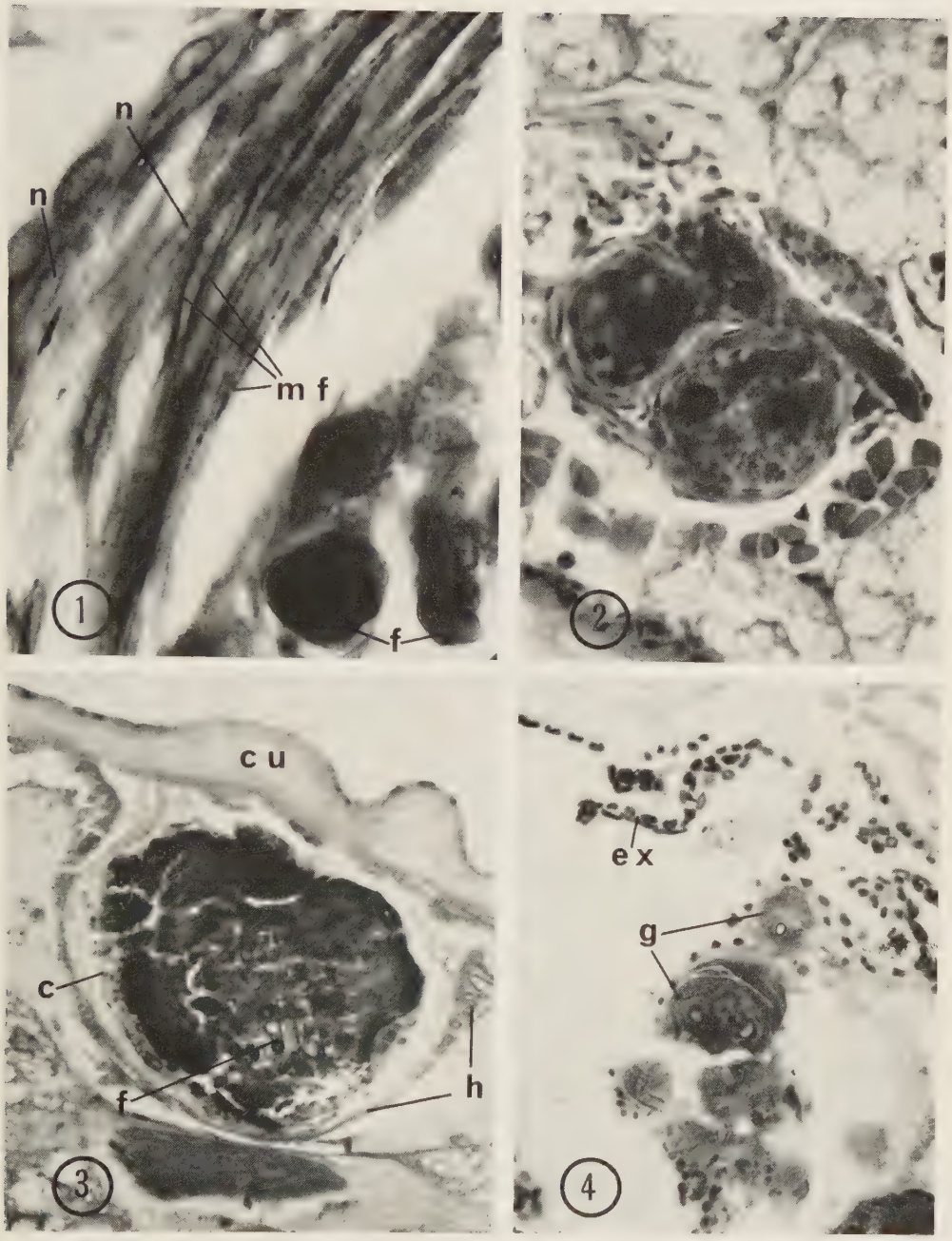
FIG. 1 à 4
Vues de coupes histologiques.

FIG. 1
Enveloppe de granulome à *A. niger* avec matériel intercellulaire montrant une très grande argyrophilie. Imprégnation argentique de GOMORI. × 1 100.
mf : matériau à aspect fibrillaire, noirâtre.
n : noyau d'hémocytes fortement étalés de la paroi du granulome.
f : filaments mycéliens.

FIG. 2
Granulome chez un imago de *G. mellonella*. Zone mélanisée très étendue. APS-Hémalun. × 430.

FIG. 3
Granulome périphérique logé entre la cuticule et l'hypoderme. Feulgen-Picro-indigocarmin. × 270.
Cu : cuticule.
c : cellules du granulome restées apparemment normales.
f : filament mycélien dans la masse pigmentée.
h : hypoderme.

FIG. 4
Granulome éliminé au cours de la mue nymphale. Hémalun-Picro-indigocarmin. × 430.
ex. : exuvie.
g : granulome.



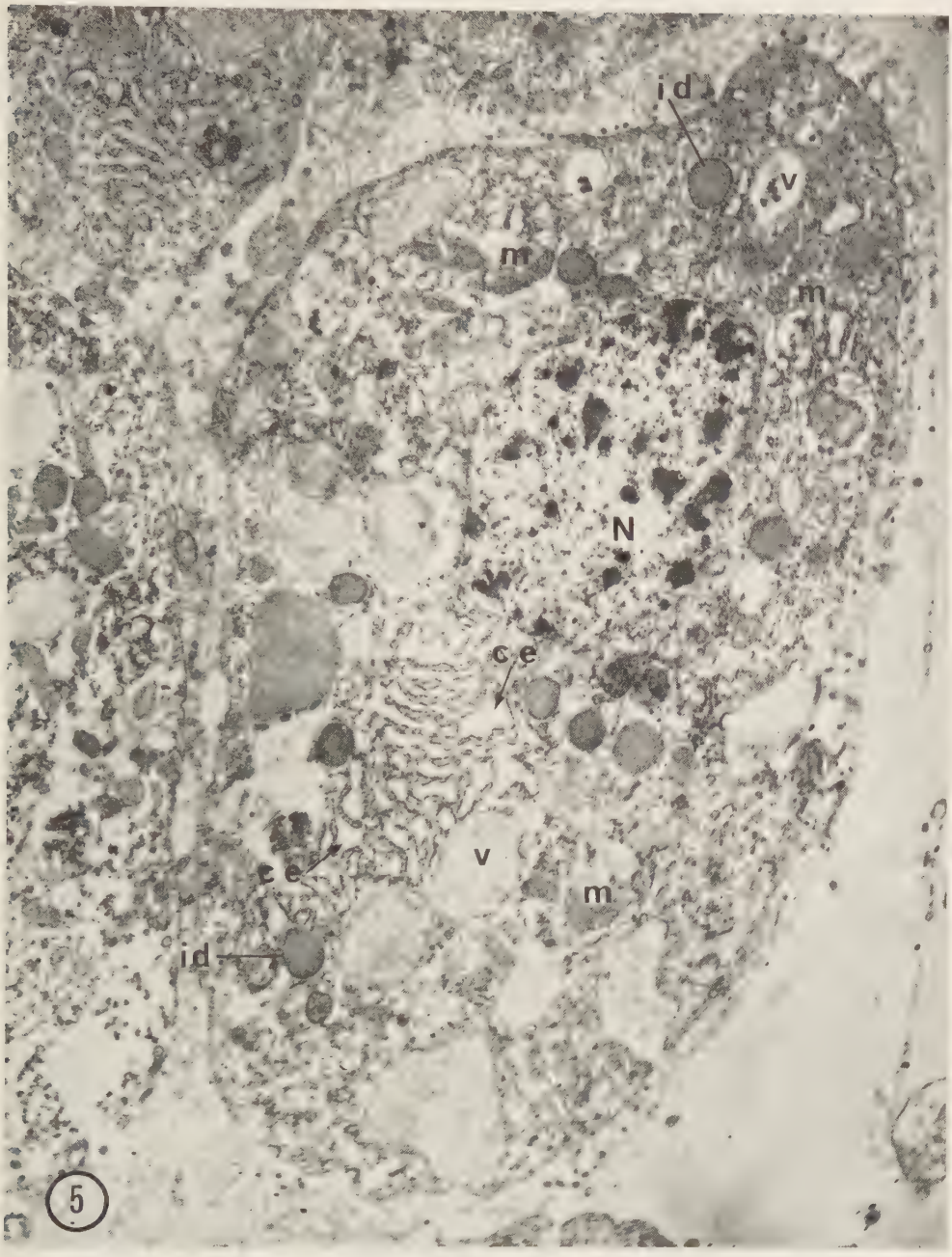
A. VEY

PLANCHE II

Fig. 5.

Type d'hémocyte participant aux réactions anticryptogamiques. Micr. Electr. × 12 000 :

N : noyau,
m : mitochondries,
v : vacuoles,
c : citernes ergastoplasmiques dilatées,
id : inclusions denses.

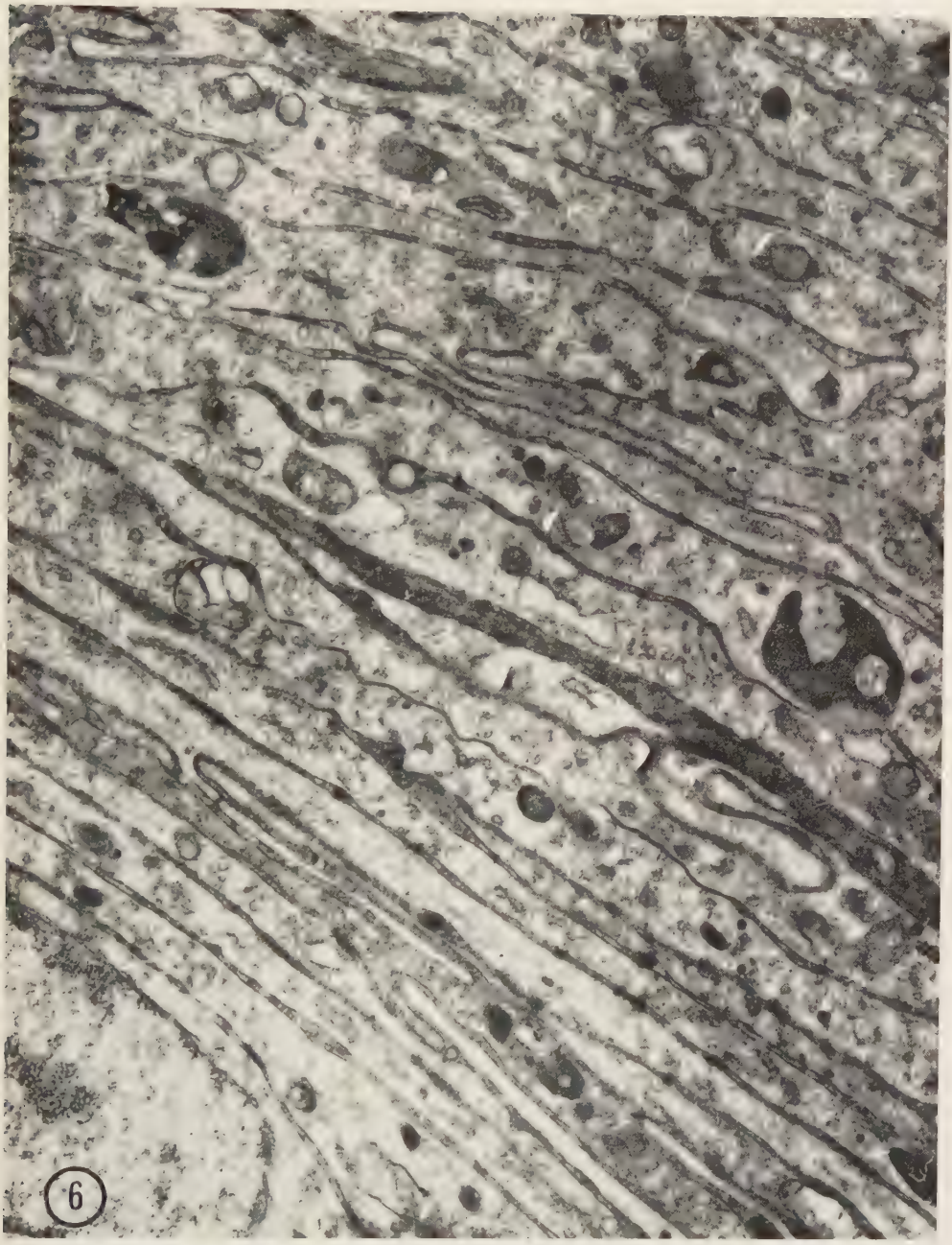


A. VEY

PLANCHE III

FIG. 6.

Aspect et disposition des cellules dans la partie de l'enveloppe du granulome à aspect feuilleté. Micr. Electr. × 18 000.



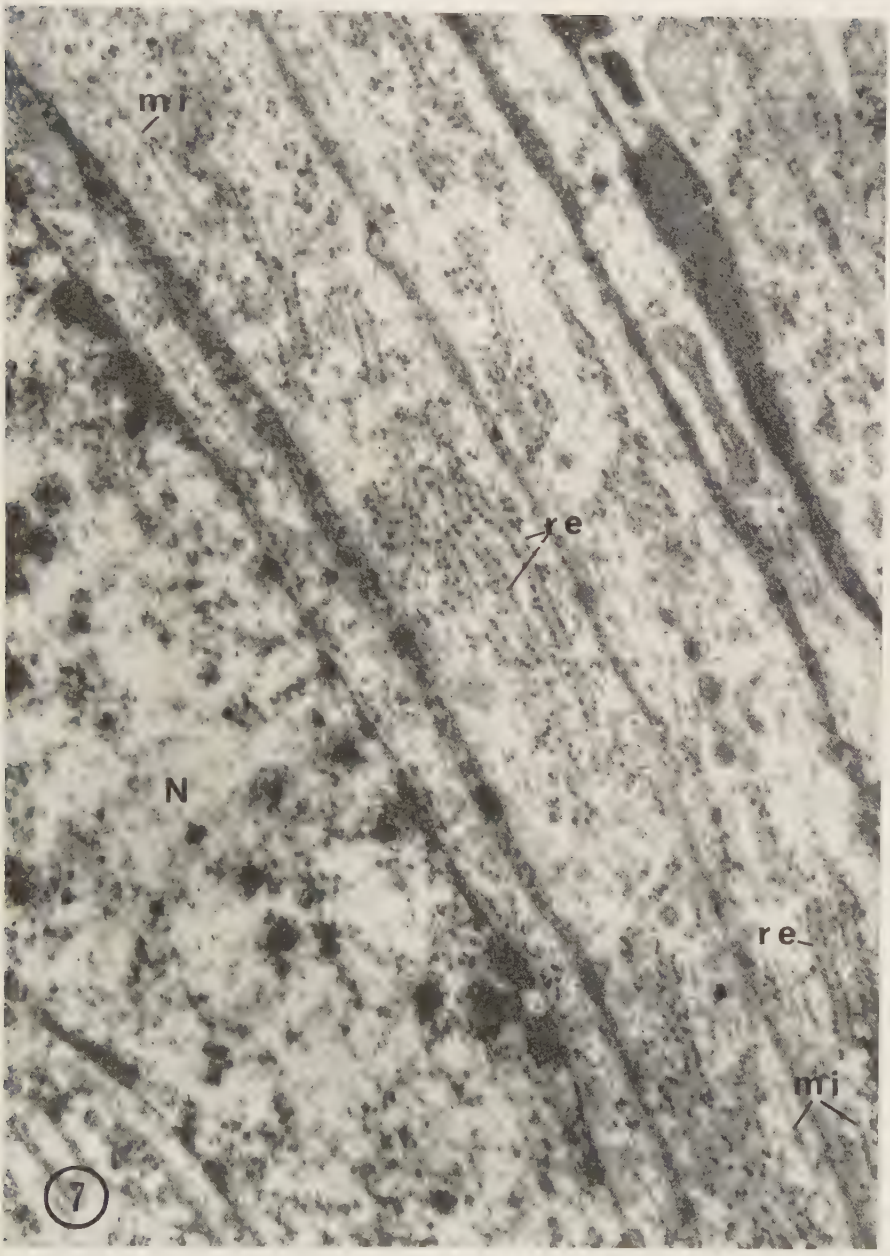
A. VEY

PLANCHE IV

Fig. 7.

Structure fine des hémocytes très étalés de la zone feuilletée. Micr. Electr. × 31 000 :

N : noyau,
re : réticulum endoplasmique granulaire tubulaire,
mi : microtubules.



A. VEY

PLANCHE V

FIG. 8.

Corps denses dans une cellule du centre de l'enveloppe hémocytaire. × 14 500.

FIG. 9.

Vacuole du type « vacuole autolytique ». × 14 500.

ml : membrane limitante,
cd : corpuscules denses,
ve : vésicules.

FIG. 10.

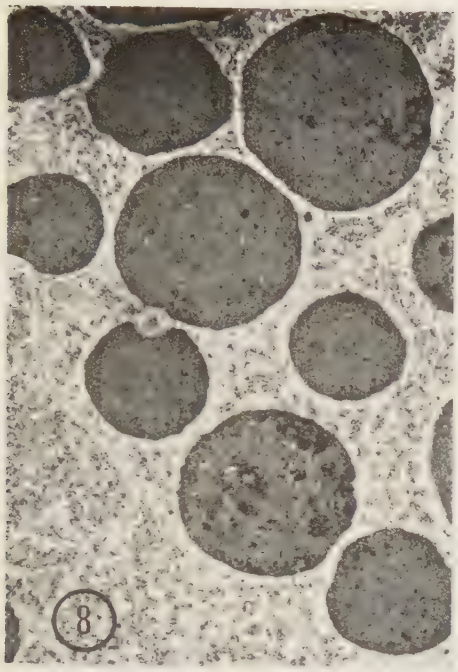
Corps « vacuolaires » comportant une substance dense, des vacuoles et un début de structure membranaire. × 18 000 :

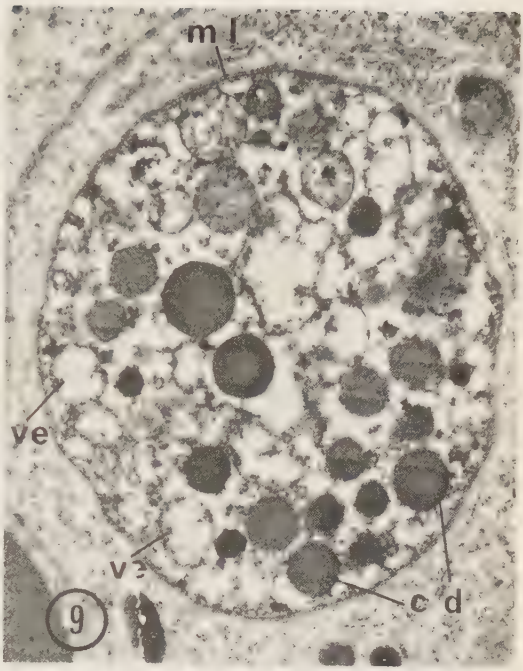
v : vacuoles,
s : substance dense.

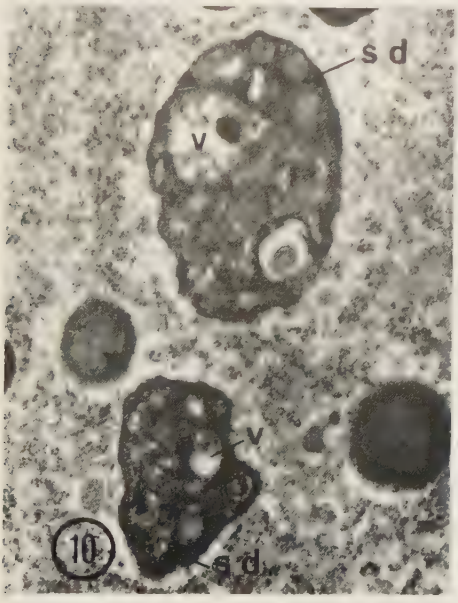
FIG. 11.

Corps à caractère résiduel et myélinique avec systèmes lamellaires (→). × 47 000.

z : zone claire.


8


m l
ve
v
c d
9


s d
v
v
s d
10

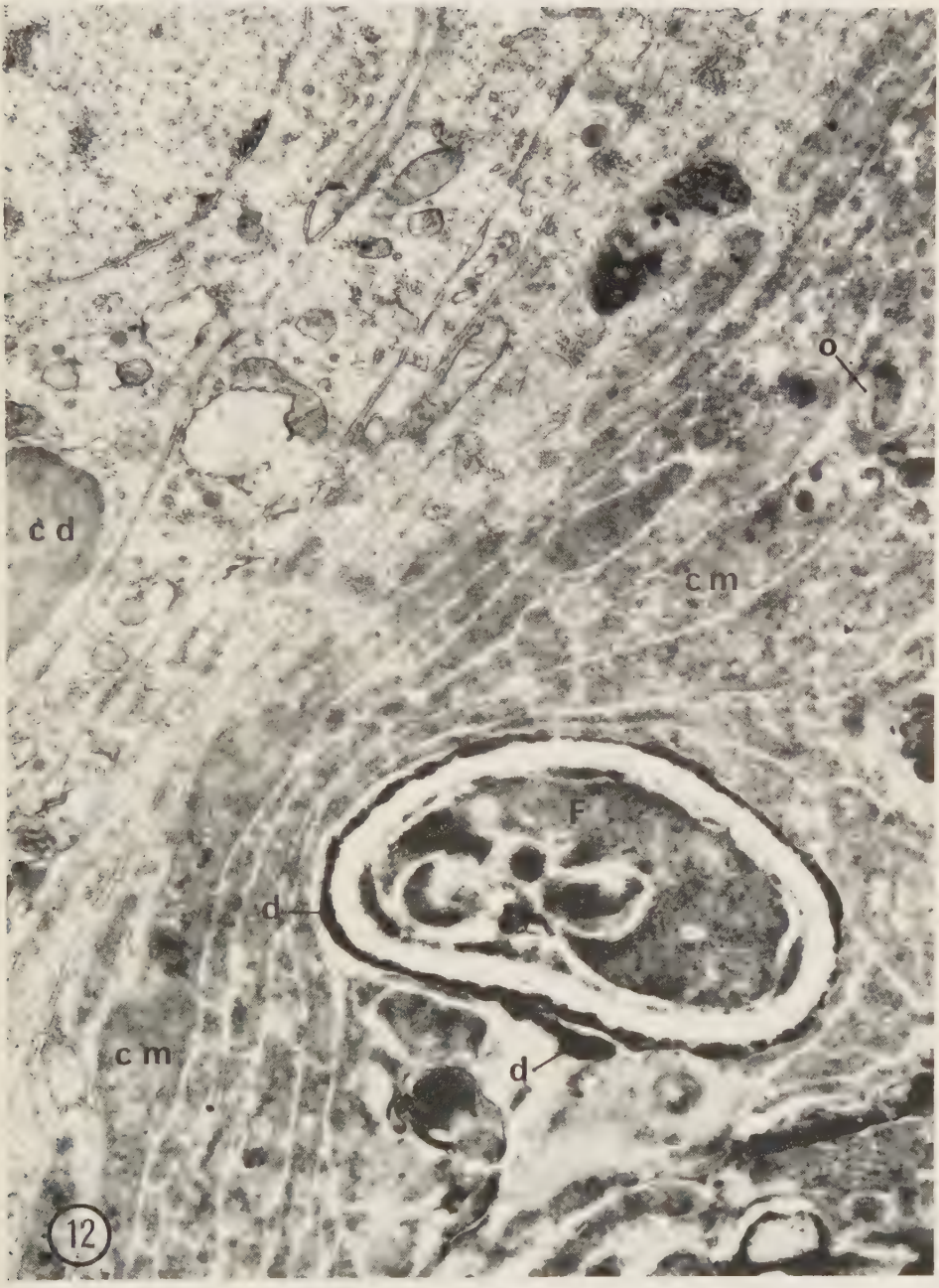
z
11

PLANCHE VI

Fig. 12.

Dépôt de mélanines autour du champignon, et mélanisation d'hémocytes proches. Micr. Electr. × 23 000.

F : filament mycélien,
d : dépôt de mélanines,
cm : cellules masquées par un fin dépôt mélanique,
o : organite cellulaire non identifiable,
cd : corps dense.



A. VEY

PLANCHE VII

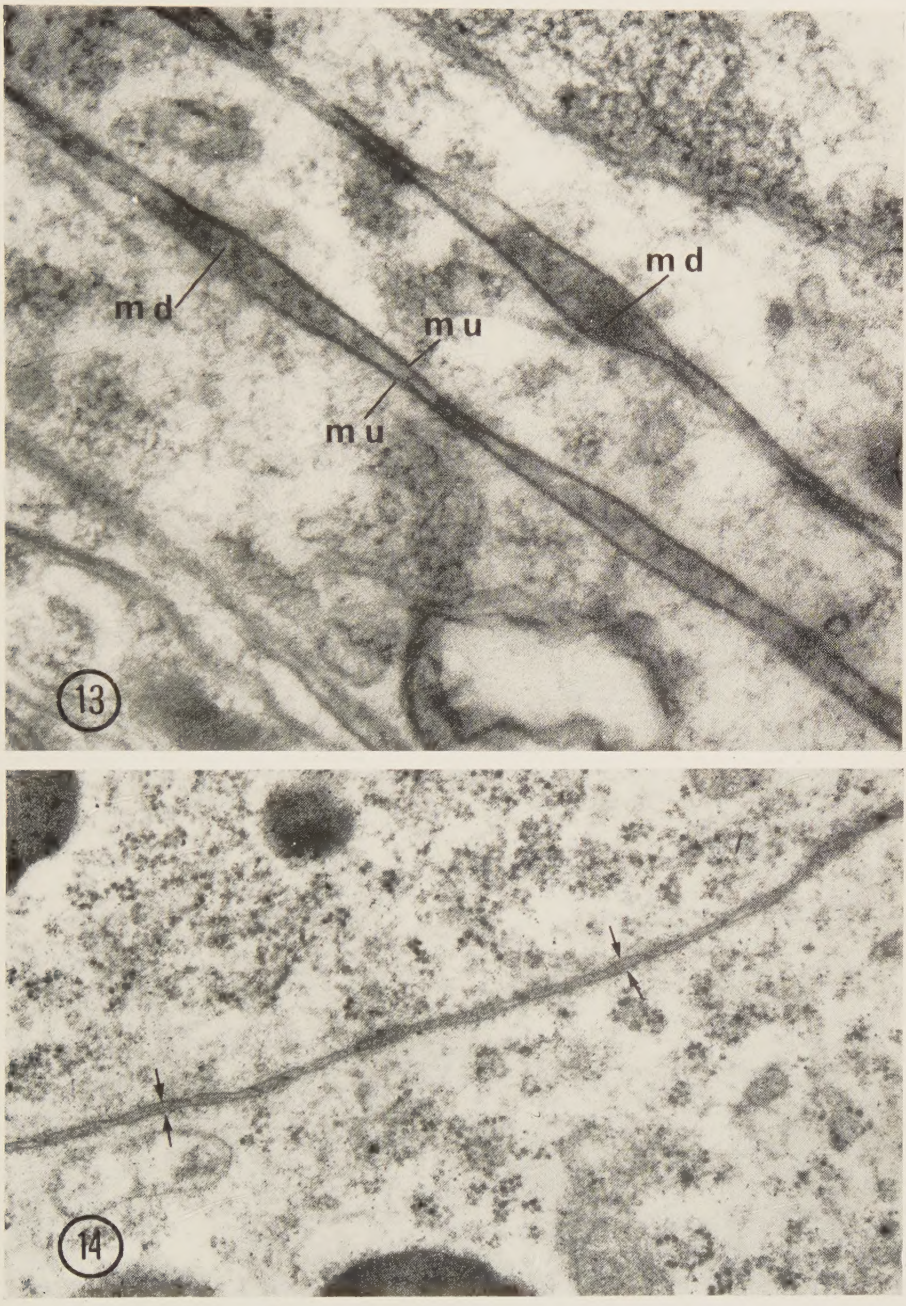
Fig. 13.

Espace intercellulaire séparant deux hémocytes voisins, et contenant un matériau dense. Micr. Electr. × 49 500 :

mu : membrane unitaire des cellules,
md : matériau dense intercellulaire.

Fig. 14.

Jonction cellulaire avec accollement intime des membranes de deux cellules contiguës. Micr. Electr. × 38 500.



A. VEY